

Silja Majaharju

Pregabaliinin ja gabapentiinin määrittämenetelmän kehittäminen ja validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

8.9.2017

<p>Tekijä(t) Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Silja Majaharju</p> <p>Pregabaliinin ja gabapentiinin määrittämenetelmän kehittäminen ja validointi</p> <p>44 sivua + 7 liitettä 8.9.2017</p>
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Oikeuskemisti Sirpa Mykkänen Lehtori Mia Ruismäki
<p>Opinnäytetyö suoritettiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen oikeustoksikologian osastolla, Tilkanmäen yksikössä.</p> <p>Työn tavoitteena oli uudistaa käytössä oleva pregabaliinin ja gabapentiinin akkreditoitu määrittämenetelmä verestä ja virtsasta käyttäen positiiviseen paineeseen perustuvaa semiautomaattista uuttokammiota. Pregabaliini ja gabapentiini ovat mm. epilepsian hoidossa käytettäviä lääkkeitä, mutta niitä on havaittu olevan myös päihdekäytössä. Käytössä oleva määrittämenetelmä on raskas käsille, koska tarvittava paine saadaan aikaan pipetoimalla käsin. Uusi uuttokammio toimii pelkästään typpikaasun avulla, eikä tarvitse sähköä.</p> <p>Menetelmässä käytettiin Agilentin GC-MS-laitteistoa elektroni-ionisaatiolla, positiivisella moodilla, elektronimonistimella ja SIM-menetelmällä. Yhdisteet uutettiin verestä kiinteäfaasiuutolla käyttäen Biotagen Positive Pressure+ 48 -uuttokammiota.</p> <p>Näytematriisien mitta-alue saatiin laajemmaksi ja molemmille matriiseille saatiin määritettyä matalampi määrittärajaa. Verimatriisille alemmaksi määrittärajaksi saatiin 1 µg/ml ja virtsamatriisille 2 µg/ml. Ylemmäksi määrittärajaksi verimatriisille saatiin 40 µg/ml, virtsalle ei ylempää määrittärajaa määritetty.</p> <p>Menetelmän validointi uudelle uuttokammialle onnistui hyvin ja laite saatiin laboratorioissa rutiinikäyttöön osaksi jo käytössä olevaa määrittämenetelmää.</p>	
Avainsanat	GC-MS, elektroni-ionisaatio, gabapentiini, pregabaliini, kiinteäfaasiuutto, silylointi, validointi

Author(s) Title Number of Pages Date	Silja Majaharju The Development and Validation of the Method for the Detection of Pregabalin and Gabapentin 44 pages + 7 appendices 8 September 2017
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Sirpa Mykkänen, Forensic Chemist Mia Ruismäki, Senior Lecturer
<p>This work was carried out at the National Institute for Health and Welfare Tilkanmäki Forensic Toxicology unit in Helsinki.</p> <p>The aim of the validation was to develop the method in use for the quantitation of pregabalin and gabapentin. The old method is quite heavy to perform, because the pressure required is done by manual pipetting. The new updated method uses a manifold which is based on positive pressure and runs with nitrogen gas only; no electricity is needed.</p> <p>The compounds of interest were extracted using Biotages Positive Pressure+ 48 -manifold with solid phase extraction cartridges and were analyzed with gas chromatography - mass spectrometry. Ionization was conducted by electron ionization (EI) using positive ion mode. Electron multiplier was used as a detector.</p> <p>The measurement range of this method got wider and both matrices obtained a new lower quantification limit. The new lower quantification limit for blood matrix was 1 µg/ml and 2 µg/ml for urine. The new upper quantification limit for blood matrix was 40 µg/ml. For urine matrix, no upper quantification limit was determined.</p> <p>The new manifold suited well for the method and was taken as a part of the routine in use.</p>	
Keywords	GC-MS, electron ionization, gabapentin, pregabalin, solid phase extraction, silylation, validation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Päihdetestaus Suomessa	1
3	Gabapentiini, pregabaliini ja valproaatti	2
3.1	Lääkehoito	3
3.2	Väärinkäyttö päihdetarkoituksessa	4
4	Pregabaliinin ja gabapentiinin näytteenkäsittelytekniikoita	4
4.1	Kiinteäfaasiuutto	5
4.2	Kiinteä-nesteuutto	6
4.3	Positiivisen paineen semiautomaattinen <i>Pressure+ 48</i> -paineammio	6
4.4	Sisäinen standardi	9
4.5	Derivatisointi	9
5	Pregabaliinin ja gabapentiinin analyysitekniikat	10
5.1.1	Nestekromatografiset menetelmät	10
5.1.2	Kaasukromatografiset menetelmät	12
5.1.3	Muut määritysmenetelmät	12
6	Kaasukromatografia-massaspektrometria, GC-MS	13
6.1	Kaasukromatografia	13
6.1.1	Kantajakaasu	13
6.1.2	Kolonnit	13
6.1.3	Näytteesyöttö	14
6.1.4	<i>Deans Switch</i> -tekniikka	15
6.1.5	Detektori	15
6.2	Massaspektrometria	16
6.2.1	Näytteesyöttö	16
6.2.2	Ionisaatio	16
6.2.3	Massa-analysaattori	17
6.2.4	Massadetektori	18
6.2.5	Massaspektri	18

6.2.6	SIM-menetelmä	19
7	Työn suoritus	20
7.1	Analyysitekniikka	21
7.2	Laiteparametrit	22
7.3	Reagenssit	23
7.4	Liuosten valmistus	24
7.5	Näytteiden käsittely	25
7.6	Kationinvaihtoon perustuva kiinteäfaasiuutto	26
7.7	Kiinteä-nesteuutto proteiinisaostuksella	27
7.8	Kiinteä-nesteuutto ilman proteiinisaostusta	28
7.9	Uuttomenetelmien vertailu	29
7.10	Ionien valinta	30
8	Validointi ja tulokset	31
8.1	Selektiivisyys ja spesifisyys	32
8.2	Lineaarisuus ja kalibrointimallin määrittäminen	32
8.3	Määritysrajat	34
8.4	Oikeellisuus	35
8.5	Toistotarkkuus	36
8.6	Analyyttien stabiilisuus	37
8.7	Saanto	38
8.8	Mittausepävarmuus	39
9	Yhteenveto	40
	Lähteet	41

Lyhenteet

DLLME	<i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i> , dispersiivinen neste-neste-mikrouutto
EI	<i>Electron ionization</i> , elektroni-ionisaatio
ESI	<i>Electrospray ionization</i> , sähkösumutusionisaatio
GABA	<i>Gamma-amino butyric acid</i> , gamma-aminovoihappo
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> , kaasukromatografia-massaspektrometria
HILIC	<i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i> , hydrofiilisen vuorovaikutuksen nestekromatografia
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> , korkean erotuskyvyn nestekromatografia
SIM	<i>Selected ion monitoring</i> , kohdeioniseuranta
SLE	<i>Solid (supported) liquid extraction</i> , kiinteä-nesteuutto
SPE	<i>Solid phase extraction</i> , kiinteäfaasiuutto
SPME	<i>Solid phase microextraction</i> , kiinteäfaasimikrouutto
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i> , tandemmassaspektrometria

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) oikeustoksikologiayksikössä. Yksikössä tuotetaan oikeustoksikologisia ja päihdetestaukseen kuuluvia tutkimuksia ja asiantuntijalausuntoja. Yksikössä tarjotaan lisäksi koulutusta ja asiantuntijapalvelua päihteisiin ja päihdetestaukseen liittyen. Vuodesta 2012 alkaen yksikössä on tehty myös jätevesitutkimusta, jolla saadaan ajankohtaista tietoa jätevesiverkoston alueella tapahtuvasta huumeiden käytöstä. [1, 2.]

Opinnäytetyön tarkoituksena oli uudistaa akkreditoitua menetelmää, jolla veri- ja virtsanäytteistä analysoidaan pregabaliini- ja gabapentiinipitoisuuksia. Lääkeaineita käytetään mm. epilepsian hoidossa, mutta niitä käytetään myös päihdetarkoituksessa. Määrittelyksiä tehdään maksullisena palveluna päihde- ja terveydenhuoltosektorille, työterveyshuollolle sekä poliisi- ja oikeusviranomaisille. Määrittelyksillä seurataan mm. potilaiden hoitoa ja vankien päihteettömyyttä. Analyysissä käytetään kaasukromatografia-massaspektrometristä (GC-MS) menetelmää yhdistettynä kohdeioniseurantaan (SIM) sekä elektronipommitukseen (EI). Menetelmän näytteenkäsittelyvaihe perustuu kiinteäfaasiuuttoon (SPE, *solid phase extraction*). Uuttomenetelmä oli tarkoitus uudistaa käyttäen semiautomaattista, positiiviseen paineeseen perustuvaa uuttokammiota. Nyt käytössä oleva menetelmä on hyvin rankka käsille. Aluksi uuttokammiota testattiin käyttäen aiemmin määrittelyksessä käytettyjä kiinteäfaasiuuttopatruunoita. Tämän jälkeen määrittelymenetelmää testattiin käyttäen nesteuuttoon (SLE, *solid (supported) liquid extraction*) perustuvaa näytteenkäsittelymenetelmää. Kiinteäfaasiuuttoon perustuva menetelmä validoitiin ja menetelmää pyrittiin laajentamaan lisäämällä menetelmään yksi uusi analyytti, valproaatti. Tulevissa kappaleissa on esitelty työhön liittyvien testusten, analyyttien ja analytiikan teoriaa. [3.]

2 Päihdetestaus Suomessa

Päihteisiin luokitellaan alkoholit, huumausaineet ja tärkeimmät väärinkäytetyt lääkeaineet, jotka luokitellaan usein myös huumausaineiksi. Päihdetestausta tehdään terveydenhoidollisin ja valvonnallisin perustein. Terveydenhoidolliset testaukset liittyvät taudinmäärittelyyn ja hoidon seurantaan. Valvonnallisia testauksia ovat liikennejuopumustestit sekä työelämän ja opiskelun aikaiset huumetestit. Vankeinhoidossa testauksella valvotaan vangin tai yhdyskuntaseuraamusasiakkaan päihteettömyyttä ja todetaan

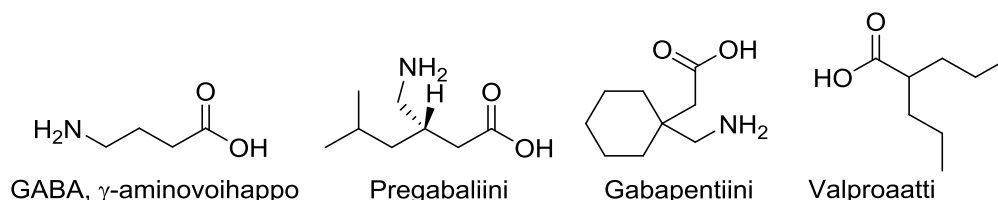
mahdollinen päihtymystila. Työelämässä joko työnantaja tai terveydenhuollon yksikkö voivat pyytää työntekijältä huumetestä. Opinnoissa päihdetestausta voidaan pyytää opiskelijalta, jos siihen on perusteltu epäily tai opiskelijalla on huumeriippuvuus. [4, 5, 6, 7.]

Jotta määrityksissä saavutetaan tarpeeksi korkea laatu, käytettäväksi suositellaan akkreditoituja laboratorioita, jolla voidaan varmistua menetelmien kuuluvan laboratorion pätevyysalueeseen. Perinteisten huumausaineiden rinnalla ovat yleistyneet ns. muuntohuumeet, jotka muistuttavat perinteisiä huumeita vaikutuksiltaan. Muuntohuumeita kehitetään jatkuvasti, jolloin yhdisteet eivät välttämättä näy perinteisissä huumeeseulonnoissa. [7.]

Tavallisimmin päihdetestausta tehdään veri- ja virtsanäytteistä. Verinäytettä suositellaan, kun halutaan selvittää akuuttia käyttöä ja aineen pitoisuutta käyttäjän elimistössä. Virtsanäytettä suositellaan, kun halutaan osoittaa päihteiden pidempiaikaista käyttöä. Päihdetestaus suoritetaan yleensä kaksivaiheisena, jossa ensin tehdään epätarkempi seulonta, jonka antama positiivinen tulos varmistetaan tarkemmalla testillä. Esimerkiksi vankeinhoidossa vankilat tekevät itse ensivaiheen seulontatestit. Huumaus- ja lääkeainetestauksessa ensimmäisenä testinä käytetään perinteisesti aineiden immunologiseen testaukseen perustuvaa seulontaa. Kaikki positiiviset tulokset varmennetaan moderneilla kromatografis-massaspektrometrillä menetelmillä. [8.]

3 Gabapentiini, pregabaliini ja valproaatti

Gabapentiini on γ -aminovoihapon (GABA) analogi (kuva 1), joka muistuttaa rakenteeltaan GABA:a, mutta ei sitoudu GABA-reseptoreihin tai vaikuta esimerkiksi GABA:n sitoutumiseen tai hajoamiseen.



Kuva 1 Määritykseen liittyvien yhdisteiden rakennekaavoja

Se saa kuitenkin aikaan hermostollisen inhibitioefektin salpaamalla jänniteherkän kalsiumkanavan kiinnittymällä sen alayksikköön, aiheuttaen kipua vähentävien neuropeptidien vapautumista. Historiallisesti gabapentiiniä käytettiin lähes huolettomasti, koska sivuvaikutuksia ja yhteisvaikutuksia muiden lääkeaineiden kanssa oli ilmoitettu varsin vähän. Sen keskushermostoon sijoittuvan vaikutuksen ansiosta sitä on käytetty lääkeaineiden ja alkoholin ongelmakäytön ja vieroitusoireiden hoidossa. [9.]

Pregabaliini on GABA:n johdannainen, antikonvulsiivinen aine. Se on edelleen kehitetty gabapentiinistä ja on rakenteeltaan myös samankaltainen, minkä takia niillä oletetaan olevan sama vaikutusmekanismi. Molemmat imeytyvät lisäksi suurten neutraalien aminohappojen kuljetusmekanismin avulla ja erittyvät muuttumattomina ($\geq 98\%$) virtsaan. Gabapentiinin imeytyminen on rajoitteista, suurina annoksina osa gabapentiinistä jää imeytymättä. [10.]

Gabapentiini ja pregabaliini ovat molemmat kahtaisioneita, eli niillä on sekä happo- että emäsryhmä, joka tekee niiden uuttamisesta vaikeampaa. Valproaatilla on rakenteessaan vain happoryhmä. Valproaatilla on useita vaikutusmekanismeja. Sitä käytettiin alun perin orgaanisten kemikaalien liuottimena. Vuonna 1961 sen antiepileptinen vaikutus selvitettiin. [11.]

3.1 Lääkehoito

Molemmat gabapentinoidit, gabapentiini ja pregabaliini, ovat tehokkaita hermovauriosta aiheutuvan kivun hoidossa. Gabapentinoidit ja valproaatti ovat antikonvulsantteja, eli epilepsian hoidossa käytettäviä lääkkeitä estämään kouristuskohtauksia. Molemmilla lääkeaineilla on lisäksi ahdistusta lievittävä vaikutus.

Gabapentiiniä käytetään paikallisalkuisissa kohtauksissa (kohtaukset alkavat paikallisesti vain toisessa aivopuoliskossa) joko yksin tai lisälääkkeenä, kun tavanomaisilla lääkkeillä ei saada toivottua tehoa. Se on myös neuropaattisen kivun hoidossa käytetty hyväksytty lääke. [12, ss. 547–548.]

Pregabaliini kehitettiin alun perin epilepsialääkkeeksi. Pregabaliinia käytetään nykyään yleistyneen ahdistushäiriön hoidossa, koska sen teho on yhtä hyvä kuin bentsodiatsepiineillä, mutta sillä on vähemmän aivoja lamaavia haittavaikutuksia. Pregabaliinia käy-

tetään myös alkoholi- ja huumeriippuvaisten hoidossa. Valproaattia käytetään epilepsian hoidon lisäksi migreenin ja kaksisuuntaisen mielialahäiriön hoidossa. [12, 13, 14.]

3.2 Väärinkäyttö päihdetarkoituksessa

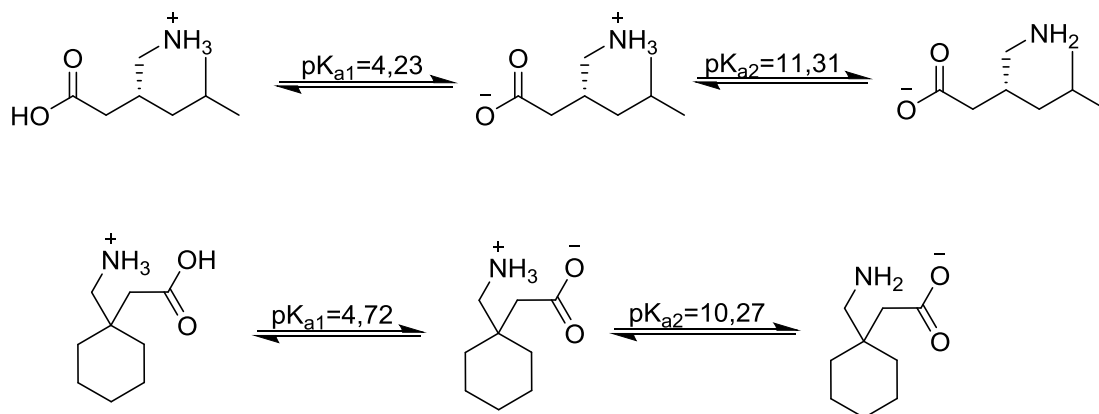
Pregabaliini on uudehkona valmisteena tullut osaksi myös päihteiden sekakäyttöä. Lääke on bentsodiatsepiineistä rakenteeltaan poikkeava, mutta väärinkäyttäjät hakevat pregabaliinista usein bentsodiatsepiinien kaltaista rauhoittavaa vaikutusta. Rauhoittavan vaikutuksen lisäksi sillä pyritään myös voimistamaan alkoholin tai opioidien vaikutusta. Pregabaliinia käytetään päihtymistarkoituksessa selvästi hoitoannoksia suurempina annoksina ja usein opioidien ja muiden huumausaineiden kanssa samanaikaisesti. Pregabaliinia käytetään suhteellisesti gabapentiiniä enemmän. [15, 16.]

Gabapentinoidien osuus myrkytyskuolemissa on kasvanut. Kun lääkeaineet ovat säännöllisessä käytössä, toleranssi kasvaa. Jonkinlaisen raittiusjakson aikana toleranssi häviää, jolloin aiemmin käytetyt annokset voivatkin olla raittiuden jälkeen tappavia. Pregabaliinia kuolemissa esiintyi tärkeimpänä löydöksenä vuonna 2009 12 kertaa, joista 11 liittyi päihdekäyttöä ja vuonna 2010 15 kertaa, joista 13 sisältyi päihdekäyttöä. Kasvanut reseptilääkkeiden väärinkäyttö on epäilemättä johtanut tahattomiin myrkytyskuolemiin. [15, 16.]

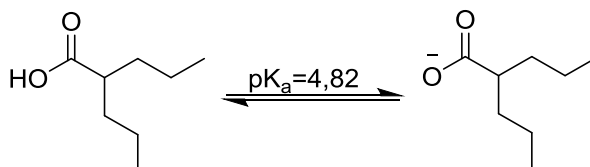
4 Pregabaliinin ja gabapentiinin näytteenkäsittelytekniikoita

Yhdisteitä voidaan usein uuttaa veri- ja virtsanäytteistä suoraan orgaanisella liuottimella. Tällainen suora metodi on kaikkein yleisimmin käytetty näytteenkäsittelytekniikka toksikologian laboratorioissa. Näytteenkäsittelyssä on käytetty mm. proteiinisäostusta ja kiinteäfaasiuuttoa. Proteiinisäostus on voitu tehdä esimerkiksi asetonitriilillä, minkä jälkeen näyte on analysoitu joko suoraan nestekromatografiaa käyttäen tai derivatisoitu ensin ja analysoitu sitten kaasukromatografiaa käyttäen. Veri- ja virtsanäytteet voidaan fraktioida neste-nesteuutolla ilman proteiinisäostusta, säätämällä liuoksen pH ensin halutuksi puskurilla, hapolla tai emäksellä. Liuoksen pH:ta säätämällä saadaan yhdiste ionisoitumattomaan muotoon, jolloin se erottuu valittuun orgaaniseen liuottimeen. Kun happamien yhdisteiden pH säädetään 2 pH-yksikköä alle niiden pK_a -arvon (tai yli emäksisten yhdisteiden tapauksessa), voidaan niiden ajatella olevaan 100-prosenttisesti ionisoitumattomassa muodossa. Kahtaisionit, joilla on kaksi ionisoituvaa

ryhmää (happo- ja emäsryhmä) muodostavat ongelman, koska ne ovat usein aina suolamuodossa. Niiden saannot ovat neste-nesteuutossa huonot. Gabapentiini ja pregabaliini ovat molemmat kahtaisioneita, eli niillä on sekä happo- että emäsryhmä, joka tekee niiden uuttamisesta vaikeampaa. Valproaatilla on rakenteessaan vain happoryhmä. Kun puskuriliuoksen pH on alle pienimmän pK_a -arvon, pregabaliini ja gabapentiini ovat täysin protonoituneita heikkoja happoja, muodostaen positiivisen varauksen (kuvat 2 ja 3). [17, ss. 67–78.]



Kuva 2 Pregabaliinin ja gabapentiinin ionisoituminen



Kuva 3 Valproaatin ionisoituminen

Neste-nesteuuton rinnalle on kehitetty uudempia menetelmiä, joilla yhdisteitä sisältävät fraktiot voidaan erotella ja puhdistaa. Yksi tällaisia tekniikoita on kiinteäfaasiuutto. Mm. kahtaisioneita voidaan eristää sopivalla kiinteäfaasiuuttotekniikalla. [17, ss. 67–78.]

4.1 Kiinteäfaasiuutto

Kiinteäfaasiuutossa (*solid phase extraction*, SPE) käytetään tilavuudeltaan pientä stationäärifaasimäärää tai polymeeriä, jolla eristetään halutut analyytit näytteestä. Yleisin

käytetty faasi on C-18. Uutto poistaa epäpuhtauksia näytematriisista niin, että analyysistä tulee helpompi. Kationinvaihtoon perustuvassa kiinteäfaasiuutossa tutkittava yhdiste kiinnittyy kationinvaihtajaan pH:n avulla. Emäksiset yhdisteet kiinnittyvät materiaaliin happamassa pH:ssa. Analyytit sisältävän liuoksen pH säädetään arvoon, joka on alle analyyttien pK_a -arvon. Tällöin koko molekyyli on protonoituneena ja analyylille on tällöin muodostanut positiivinen varaus. Kun analyytit ovat kiinnittyneet, patruunaa pystytään pesemään liuottimilla, jolloin muut kuin halutut yhdisteet saadaan pestyä pois. Kun patruunaan lisätään emäksistä eluointiliuosta, saadaan emäksinen tutkittava yhdiste irtomaan kationinvaihtomateriaalista. [18, 19, 20.]

4.2 Kiinteä-nesteuutto

Solid (supported) liquid extraction -uutolla (SLE) tarkoitetaan nesteuuttoa, jossa käytetään inerttiä kantaja-ainetta. Nesteuutto on tekniikaltaan neste-nesteuuttoa vastaava, mutta on yksinkertaisempi, sillä se sisältää vain kolme vaihetta: analyytin lataus, odotus ja eluointi. SLE:ssä käytetään piimaata nesteuuton sorbenttina. Näytteet laimennetaan sellaisella sopivalla puskuriliuoksella, jolla varmistetaan, että analyytit ovat neutraalissa muodossa. Kuvista ja voidaan nähdä kuvaajien korkeimmat alueet, joissa analyytit ovat ionittomassa muodossa. Laimennuksen jälkeen näytteet ladataan sorbenttiin, jolloin vesiliuos imeytyy piimaahan kuten sieneen. Halutut analyytit erottuvat veteen sekoittumattomaan liuottimeen, josta ne voidaan eluoida. Epäpuhtaudet jäävät sorbenttiin jäävään vesifaasiin. Markkinoille on tullut myös synteettisiä SLE-sorbenttimateriaaleja. Synteettiset materiaalit helpottavat haasteita, jotka liittyvät luonnonvarojen saatavuuteen ja koostumukseen: sorbentit valmistetaan laboratoriossa ja käyvät läpi tarkat laadunvalvontaohjeet. [21, 22.]

4.3 Positiivisen paineen semiautomaattinen *Pressure+ 48* -paineammio

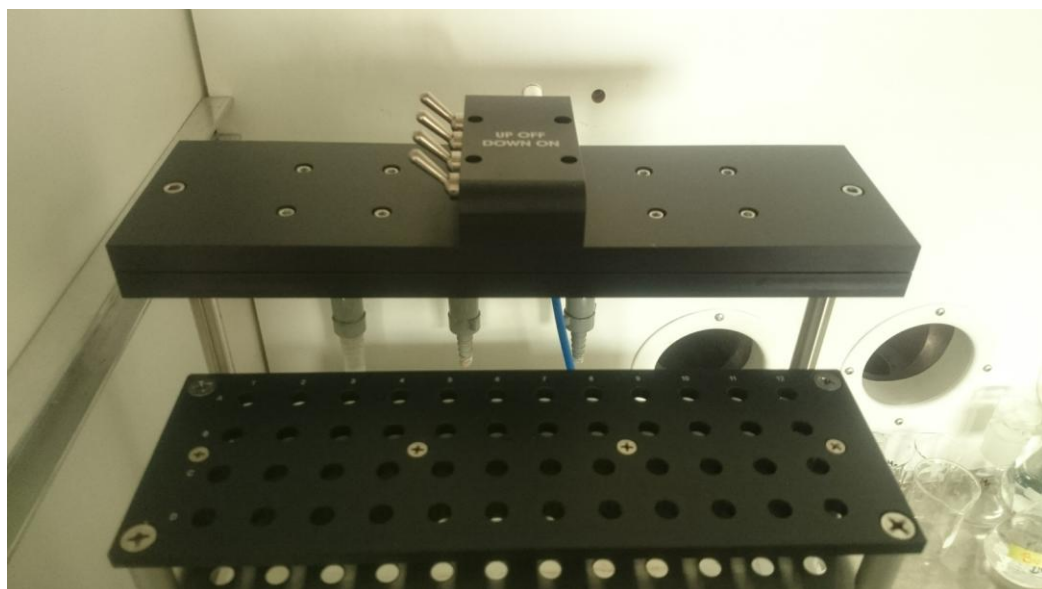
Semiautomaattinen painekammio on kehitetty helpottamaan ja nopeuttamaan näytteiden esikäsittelyä, vaikuttamatta negatiivisesti saantoon tai uuttotehokkuuteen. Paine-kammiota voidaan käyttää kiinteäfaasiuutossa, proteiinisaostuksessa tai nesteuutossa lähes millaisille näytetyypeille tahansa. Laitteeseen ei tarvita sähkövirtaa, se operoi täysin typpikaasun avulla. Tämän vuoksi laite on myös helppo asentaa. Kammion avulla voidaan saavuttaa jopa 100 psi:n paine, jonka vuoksi laitetta voidaan käyttää myös viskooseille näytteille. Painetta on nopea ja helppo säätää kahden säätimen ja rotamet-

rin avulla (kuva 4). Laitetta voidaan käyttää jopa 6 ml patruunoiden käsittelyyn ilman lisävarusteiden hankkimista. [23, 24.]



Kuva 4 Paineekammion ohjauspaneeli

Telineessä on paikat yhteensä 48 uuttopatruunalle neljässä rivissä. Pitkälle suunnitellun tuotteen myötä kammiossa voidaan käyttää myös vajaita rivejä, eivätkä tyhjät paikat vaikuta virtausnopeuksiin. Päällä olevien neljän kytkimen avulla voidaan valita käytössä olevat rivit (kuva 5). [23, 24.]



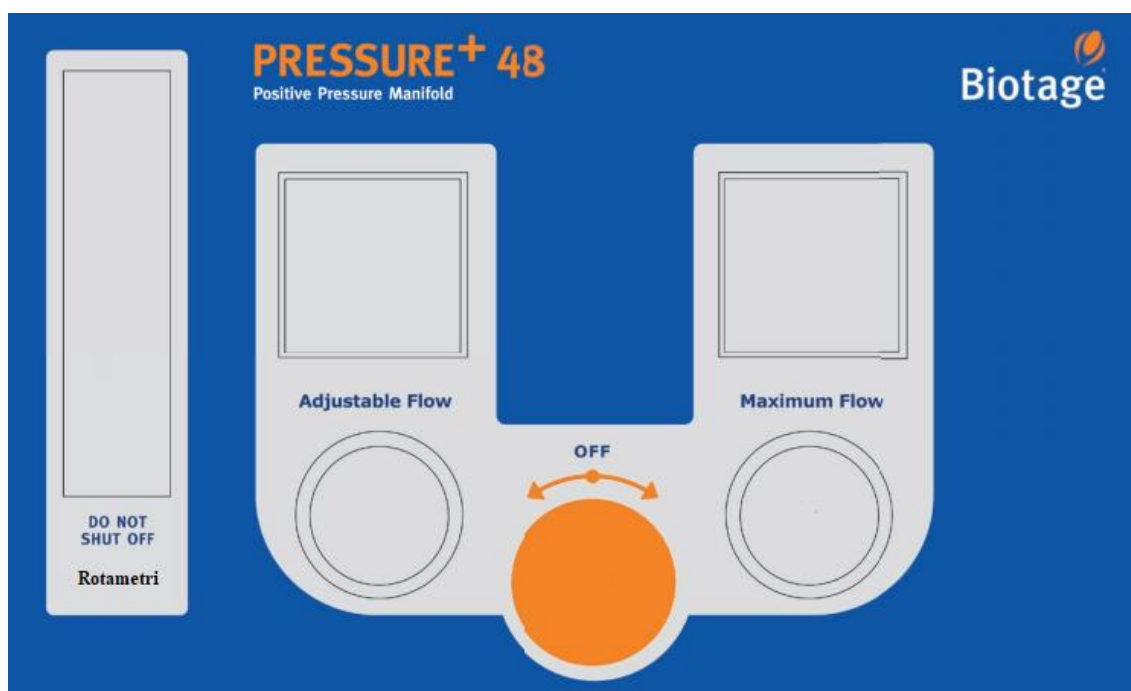
Kuva 5 Alla painekammion teline uuttopatruunoille ja yllä kytkimet tyyppä varten

Laitteen operointi on varsin yksinkertaista. Telineet sopivat laitteeseen ja toistensa päälle vain yhdessä asennossa. Patruunateline on pesun jälkeen helppo nostaa pois jäteastian päältä keräystelineen päälle, jossa on uuttoliuoksen keräysputket. Telinealusta on helppo liu'uttaa tiivisteiden alle ja sieltä pois (kuva 6). Keinupainikkeilla toimiva kammion tiiviste painautuu alas, kun painikkeita painetaan alas yhtä aikaa vähintään 3 sekuntia. Yhtäaikainen painaminen on myös varotoimenpide, jolla saadaan pidettyä kädet vapaana liikkuvista osista operaation aikana. Kammion ylempi tiivisteosa saadaan takaisin ylös painamalla kytkimiä yhtä aikaa ylös. [23, 24.]



Kuva 6 Painekammio ja sen jäteastia

Painekammiossa on kaksitasoinen kaasunsyöttöjärjestelmä. Virtauksenohjauskytkimellä säädetään kaasuvirtaus päälle ja pois (kuva 7). Kun kytkin käännetään "*Adjustable flow*" -asentoon, kaasu ohjautuu virtaussäätimen ja rotametrin kautta, joita voidaan erikseen säätää omista kytkimistään. Virtausnopeuskytkimellä ja rotametrillä voidaan säätää paineita 0–15 psi:n ja virtausnopeuksia 0–1180 ml/min välillä. Rotametriä ei tulisi koskaan sulkea kokonaan, koska tämä voi vahingoittaa rotametrin neulaa ja siten koko yksikköä. Kun virtauksenohjauskytkin käännetään "*Maximum flow*" -asentoon, sitä voidaan säätää jälleen omasta kytkimestään. Maksimivirtauksia käytetään patruunoiden pesuun, kuivaukseen jne. Virtauksia voidaan säätää 0–100 psi:n välillä ja sitä suositellaan käytettäväksi erittäin viskoosien tai likaisten näytteiden kanssa. [24.]



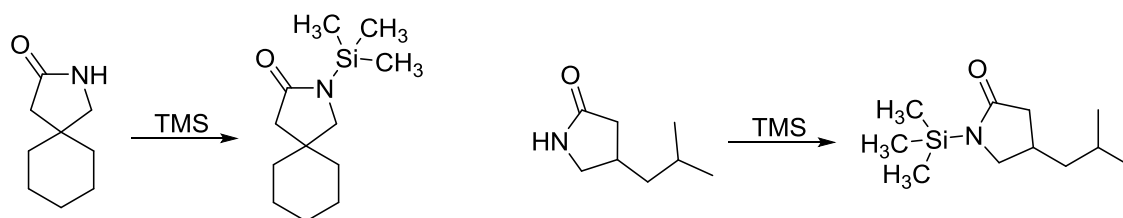
Kuva 7 Piirros painekammion säätimistä [24].

4.4 Sisäinen standardi

Sisäisellä standardilla tarkoitetaan sitä, kun määrittämiseen lisätään tarkasti tunnettua, mutta toista ainetta kuin mitä ollaan määrittämässä. Standardi lisätään esimerkiksi puskuriliuokseen tai uuttoliuokseen. Kalibrointiliuosten pitoisuudet kattavat koko kalibrointialueen, mutta sisäistä standardia lisätään kaikkiin sama määrä. Analyytin mittaus-signaalin arvot määritetään tutkittavalla pitoisuusalueella. Sen arvoa verrataan sisäisen standardin antamaan signaaliin. Analyytin ja sisäisen standardin oletetaan olevan tutkittavalla pitoisuustasolla samalla tavalla suoraan verrannollisia konsentraatioon. [25.]

4.5 Derivatisointi

Jotta yhdisteitä voidaan analysoida GC-MS:llä, tulee varmistaa, ettei yhdisteissä ole jäljellä polaarisia ryhmiä. Derivoinnissa polaarisen ryhmän tilalle liitetään pooliton ryhmä, esimerkiksi silyyliryhmä. Derivatisointireaktioita ovat alkylointi, silylointi, asylointi ja kiraalinen derivatisointi. Näytteiden derivatisointiin käytettiin silylointia, jossa yhdisteet saadaan helpommin haihtuviksi ja stabiilimmiksi trimetyylisilyyli johdannaisiksi (kuva 8). [26, 20.]



Kuva 8 Gabapentiinin ja pregabaliinin silylointireaktiotuotteet

5 Pregabaliinin ja gabapentiinin analyysitekniikat

Näytteenkäsittelyvaiheen jälkeen pregabaliinia ja gabapentiiniä on seulottu ja kvantitoitu kokoverestä, seerumista ja virtsasta erilaisilla menetelmillä. Yksinkertaiset kromatografiset menetelmät eivät käy analyyteille, johtuen niiden haihtumattomuudesta ja kromoforien puutteesta. Tästä syystä useimmissa HPLC-tekniikkaan perustuvissa julkaisuissa analyytit pitää derivatisoida, jotta ne voidaan havaita fluoresenssi- tai UV-detektorilla. Kirjallisuudesta löytyy kuitenkin julkaisuja, joissa gabapentiiniä on määritetty HPLC-tekniikalla ilman derivatisointia, matalilla UV-aallonpituuksilla. LC-MS/MS-tekniikassa analyyttejä ei puolestaan tarvitse derivatisoida. LC-MS-tekniikasta on tullut yleisin antiepileptisten aineiden erotteluun käytetyistä tekniikoista, mutta GC-MS-tekniikka on myös yleinen. GC-MS-tekniikalla analysoitaessa analyytit tarvitsevat derivatisointia. Pregabaliinin ja gabapentiinin määrittämisessä on käytetty derivatisointiaineina muun muassa erilaisia alkyyliklooriformiaatteja. [27, 28, 29, 30.]

5.1.1 Nestekromatografiset menetelmät

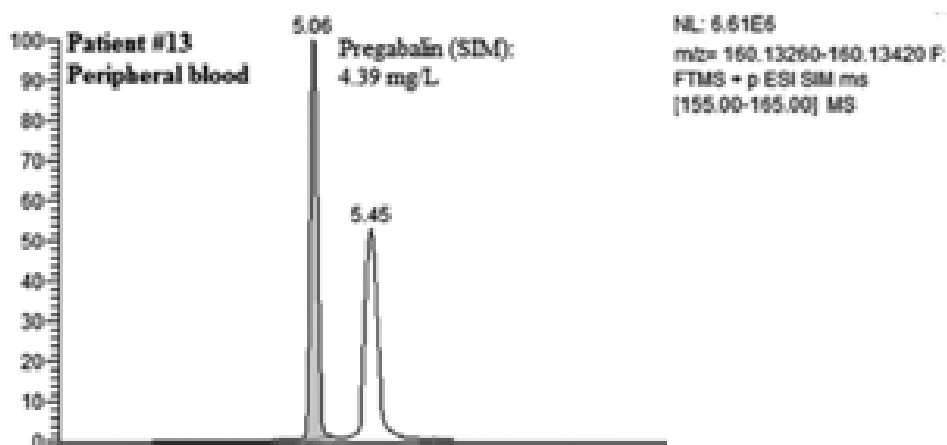
Antiepileptisiä yhdisteitä on määritetty suoraan käyttäen UPLC-MS/MS-tekniikkaa käänteisfaasikolonilla, mutta pieni molekyylipaino ja korkea polaarisuus tuottavat haasteita tälle metodille.

Vuonna 2011 *Heltsley et al.* määrittivät gabapentiiniä ja pregabaliinia virtsasta LC-ESI-MS/MS-tekniikalla. Tämän menetelmän avulla seurattiin kroonisesta kivusta kärsiviä potilaita, miten he noudattavat lääkitysohjeitaan. Määritysrajaksi virtsasta saatiin tällä tekniikalla 2,5 µg/ml. Vuonna 2017 *Nahar et al.* määrittivät gabapentiiniä ja pregabaliinia vainajien kokoverestä LC-ESI-MS/MS-tekniikalla MRM-moodilla. Näytteen esikäsittely tehtiin suorittamalla yksinkertainen proteiinisaostus asetonitriilillä. Menetelmä oli hyvin selektiivinen, eikä sillä havaittu häiritseviä endogeenisiä yhdisteitä. Määritysraja

molemmille yhdisteille oli 0,5 µg/ml. Tämän metodin todettiin olevan parempi valinta yhdisteiden seulontaan kuin kvantitointiin. [27, 31.]

Hydrofiilisen vuorovaikutuksen nestekromatografiaa (HILIC) on käytetty vaihtoehtoisena menetelmänä polaaristen antileptisten yhdisteiden erottelussa. HILIC on 2000-luvulla yleistynyt polaaristen, pienen molekyylipainon yhdisteiden erottelussa. Siinä orgaanisen eluentin osuus on suurempi. Vuonna 2009 *Oertel et al.* käyttivät HILIC-tekniikkaa yhdistettynä ESI-tandemmassaspektrometriin. He määrittivät mm. pregabaliinia ja gabapentiiniä ihmisen seerumista. Näytteenkäsittelymenetelmänä he käyttivät myös proteiinisaostusta asetonitriilillä. Pienimmät standardit olivat pitoisuudeltaan 0,312 µg/ml, joka oli myös menetelmän määrittäysraja. [28, 32.]

Priez-Barallon et alin vuoden 2014 menetelmässä määritettiin pregabaliinia muun muassa vainajien kokoverestä ja virtsasta. HILIC yhdistettiin korkean resoluution massaspektrometriin, Orbitrapiin. Menetelmässä ei käytetty klassista tandemmassatekniikkaa, jossa tytärioneilla on pieni molekyylipaino, jolloin herkkyys kärsii. Tässä menetelmässä pregabaliinin määrittäysraja oli kokoverellä vain 0,06 µg/ml. Näytteenkäsittely sisälsi myös proteiinisaostuksen asetonitriilillä, minkä jälkeen supernatantti voitiin injektoida suoraan. Verinäytteiden kromatogrammeissa havaittiin pregabaliinia retentioajalla 5,1 min ja sitä vastaava häiriöpiikki retentioajalla 5,45 min (kuva 9). [33.]



Kuva 9 Pregabaliini ja sen isobaarinen yhdiste [33].

Häiriöpiikin tandemmassaspektrin perusteella *Priez-Barallon et al* päättelivät toisen yhdisteen olevan isobaarinen yhdiste, jolla on sama empiirinen kaava eli sama molekyylipaino kuin pregabaliinilla, mutta jota ei voitu tunnistaa. Se saattoi olla myös endogeeninen tuote. [33.]

5.1.2 Kaasukromatografiset menetelmät

Vuonna 2012 *Mudiam et al.* määrittivät pregabaliinia virtsasta ja valmisteilla olevista lääkevalmisteista käyttäen kiinteäfaasimikrouuttoa (SPME) ja dispersiivistä neste-nestemikrouuttoa (DLLME) erotusmenetelmänä sekä kolmea eri alkyyliliklooriformiaattia derivatisointiaineena. Derivatisointiaineina testattiin metyyli-, etyyli- ja isobutyyliliklooriformiaattia. Pregabaliinin aminoryhmä muuttui derivatisoinnin myötä karbamaatiksi ja happoryhmä esteriksi, jolloin näytteet voitiin analysoida GC-MS:llä. Tätä derivatisoimistapaa pidetään silylointia nopeampana, luotettavana ja taloudellisempana. Alkyyliliklooriformiaattiderivatisoinnissa ei tarvita lämmitystä ja se voidaan suorittaa vesiliuoksessa. [30.]

Vuonna 2016 *Hložek et al* kvantitoivat gabapentiiniä ja pregabaliinia ihmisen seerumista neste-nesteuutolla, derivatisoimalla yhdisteet pidemmällä alkyyliliklooriformiaateilla kuin edellä ja analysoimalla GC-MS:lla. Heksyyliklooriformiaattiderivatisoinnilla saatiin syntyneille yhdisteille suurimmat vasteet. [32.]

Sadones et al määrittivät gabapentiiniä uudella DBS-tekniikalla, jossa verinäyte imeytetään suodatipaperille ja annetaan kuivua. Näyte analysoidaan yleensä joko HPLC-tekniikalla tai DNA:ta monistamalla. *Sadones et al.* määrittivät veritäplän diabeteksen hoidossa tutulla tekniikalla, jossa sormenpään pistetään neulalla reikä ja imetään testiliuskalle kapillaari-ilmion avulla. Tässä menetelmässä käytettiin kaasukromatografis-massaspektrometriaa mikroaaltouuniavusteisella derivatisoinnilla. Näytteet derivatoitiin heptafluoributanolilla. Määritysrajana menetelmässä oli 1 µg/ml. Menetelmä ei vaadi normaaliin toksikologiseen laboratorioon minkäänlaista laitteiston päivitystä, vain normaalisti rutiinikäytössä oleva laitteisto on tarpeellinen. [34.]

5.1.3 Muut määritysmenetelmät

Gabapentiiniä on määritetty plasmasta ja virtsasta käyttäen kapillaarielektroforeesiä ja UV- ja laserindusoitua fluoresenssidetektoria. *Garcia et al.* olivat vuonna 1995 kehilleet gabapentiinin määrittämiseksi plasmasta kapillaarielektroforeesi-UV-detektorimenetelmän. Näyte derivatoitiin käyttäen fluoreskiamiinia, joka itsessään ei fluoresoi, mutta primääristen amiinien kanssa reagoidessaan muodostaa voimakkaasti fluoresoivan yhdisteen. Menetelmä kärsi kuitenkin huonosta herkkyydestä. Laserindusoidussa fluoresenssidetektointimenetelmässä on käytetty useita erilaisia derivatisoin-

tiaineita, jotta analyytit saataisiin fluoresoiviksi, mutta niiden ongelmina on ollut mm. hitaus, korkea hinta ja epäpuhtaat piikit. [35.]

6 Kaasukromatografia-massaspektrometria, GC-MS

6.1 Kaasukromatografia

Kaasu-nestekromatografiassa on kaasu liikkuvana faasina ja neste stationääri faasina. Kaasukromatografiaa käytetään haihtuvien ja termisesti stabiilien yhdisteiden erotte-
luun. Myös huonosti haihtuvat yhdisteet voidaan muokata kaasukromatografille sopi-
vaksi muodostamalla niistä helpommin haihtuvia johdoksia. Näyte syötetään injektoriin
ja höyrystetään. Kolonnissa, jonka lämpötilaa voidaan säädellä uunin avulla, yhdisteen
komponentit erottuvat ja jakautuvat faasien välillä. Erottuessaan yhdisteet kulkeutuvat
eri nopeuksilla detektorille. [36, s. 155.]

6.1.1 Kantajakaasu

Kaasukromatografiassa kaasufaasissa oleva näyte kuljetetaan kolonnin läpi, käyttäen
liikkuvana faasina kantokaasua (usein He, H₂ tai N₂). Kantokaasun valinta riippuu de-
tektorista ja halutusta erotustehokkuudesta ja -nopeudesta. Helium on yleisimmin käy-
tetty kantokaasu ja on yhteensopiva useiden detektoreiden kanssa. H₂ ja He antavat
paremman resoluution ja pienemmän pohjankorkeuden kuin N₂. Useimmat analyysit
ajetaan 1,5–2-kertaisilla nopeuksilla optimiin verrattuna, koska tällöin saavutetaan pa-
ras tehokkuus, vaikka resoluutio hieman kärsisikin. [18, ss. 537–538.]

6.1.2 Kolonnit

Näyte injektoidaan kuumaan injektoriin, jolloin se haihtuu. Kolonnit ovat tyypillisesti 15–
100 m pitkiä. Pituus vaikuttaa suoraan analyysiaikaan ja resoluutioon. Kolonnien sisä-
halkaisija on tyypillisesti 0,1–0,53 mm. Kapeat kolonnit tarjoavat väljempiä korkeam-
man resoluution, mutta tarvitsevat korkeamman paineen ja niillä on pienempi näytöka-
pasiteetti. Halkaisijaltaan 0,32 mm suuremmat kolonnit tapaavat ylikuormittaa massa-
spektrometrin kaasunkäsittelyjärjestelmää, jolloin kaasunsyöttöä joudutaan jakamaan.
[36, 18, 37.]

Kaasukromatografiassa käytetyt kolonnit ovat useimmiten synteettisestä piidioksidista valmistettuja avoputkikolonneja. Kolonnissa on sen sisäseinällä nestemäinen ja termisesti sekä kemiallisesti stabiili stationäärifaasi ohuena 0,1–5 µm paksuna filminä. Yleiset faasit ovat polymeerifaaseja kuten polysiloksaania, polyfenolieetteriä ja polyetyleeniglykoleja. Stationäärifaasin tulee olla liikkumaton korkeissakin lämpötiloissa, mutta myös nestemäinen matalissa lämpötiloissa. Filmin paksuuden kasvaessa retentioaika ja näytekapasiteetti, sekä aikaisin eluoituvien piikkien resoluutiot kasvavat. Tällöin erotustehokkuus kuitenkin heikkenee. Paksummat filmit voivat myös pienentää piikkien häntimistä, mutta voivat myös kasvattaa vuotojen mahdollisuutta. Stationäärifaasin valinta riippuu analyttien poolisuudesta, pooliselle analytille valitaan poolinen faasi ja päinvastoin. [36, s. 156.]

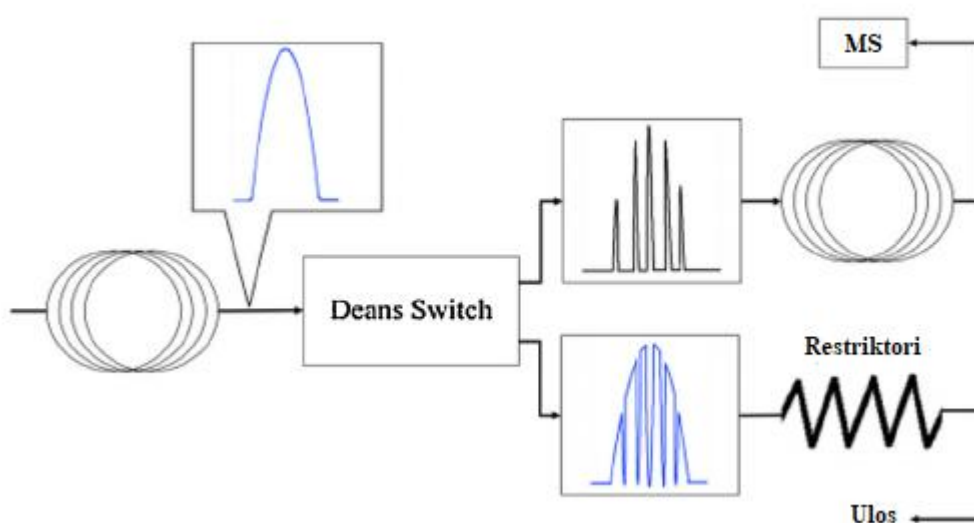
6.1.3 Näytteensyöttö

Näytteensyöttötekniikalla on suora vaikutus piikin muotoon sekä kvantitatiivisen tuloksen tarkkuuteen ja toistettavuuteen. Tekniikan valinta riippuu näytteestä, tutkittavasta analyytistä ja laitteistosta. Jos näyte sisältää analyttiä hyvin vähän, käytetään näytteensyötössä suorainjektiota (*splitless*). Se on GC-MS -tekniikoissa yleisimmin käytetty näytteensyöttömenetelmä. Näyte syötetään kuumaan höyrystyvään injektoriin josta se kulkee kantajakaasun avulla kolonniin. Suorainjektiossa jakoventtiili on suljettu injektoinnin ajan, jolloin suurin osa näytteestä kulkeutuu kolonniin sen sijaan, että osa siitä kulkeutuu venttiilin kautta pois. Höyrystynyt näyte viipyy injektorissa kauemmin, jolloin sen siirtyminen kolonniin kestää pidempään. Suorainjektioilla saadaan korkeammat määritysrajat kuin jakoinjektioilla. Suorainjektiossa kaasun virtaus injektorilasissa on sama kuin kolonnissa, jopa vain 0,5 ml/min. [36, 18.]

Analyttien höyrynpaineiden tulee kasvaa tarpeeksi, siksi kolonnin tarvitsee olla tarpeeksi lämmin: silloin analyytit voivat eluoitua järkevään aikaan. Kolonniuuni on tyypillisesti kiertoilmauuni, jonka lämpötilaa säädellään lämpötilaohjelman avulla. Kolonnin lämpötilaa nostetaan analyttien erottumisen aikana, jotta liuottimen höyrynpaine kasvaa ja myöhemmin eluoituvien yhdisteiden retentioajat lyhenevät ja piikit kapenevat. [18, s. 529.]

6.1.4 Deans Switch -tekniikka

Deans Switch -tekniikka on ollut käytössä vuodesta 1967. Monimutkaisissa matriiseissa, kuten veressä, on yleensä liian paljon päällekkäin meneviä yhdisteitä, jotta saavutettaisiin tarvittava resoluutio. Ensimmäisestä kolonnista tuleva liuos johtuu suoraan restriktoriin, kun kytkin on OFF-asennossa. Liuos johtuu toiseen, erilaisen stationääri- faasin omaavaan kolonniin ja detektorille, kun kytkin on ON-asennossa. Yhdisteet, jotka eluoituvat analyytin kanssa esikolonnissa, erottuvat analyytistä toisessa, polaari- suudeltaan erilaisessa analyysikolonnissa. Periaate on esitetty yksinkertaistetussa muodossa kuvassa 10. [38.]



Kuva 10 Yksinkertaistettu havainnekuva *Deans Switch* -tekniikasta. [39] muokaten.

6.1.5 Detektori

Kaasukromatografiin liitettävien detektoreiden toiminta perustuu yleensä analyyttien ionisaatioon tai muuhun ominaisuuteen, joka muutetaan sähköiseksi signaaliksi. Detektorit ovat ominaisuuksiltaan yleisdetektoreita, selektiivisiä tai spesifisiä detektoreita. Yleisdetektoreita ovat mm. atomiemiissiodetektori ja massaspektrometri. Selektiiviset detektorit reagoivat vain yhteen ominaisuuteen, kuten esim., liekkifotometrinen detektori joka reagoi yhteen alkuaineeseen. Spesifiset detektorit reagoivat tiettyihin, kemiallisilta ominaisuuksiltaan samanlaisiin komponentteihin. GC-MS-tekniikassa massaspektrometri toimii detektorina. Kaasukromatografian kolonni liitetään suoraan massaspektrometrin ionisaatiokammioon. Detektoria pidetään kolonnin korkeammassa lämpötilassa, jotta kaikki analyytit pysyvät kaasumuodossa. [18, s. 529.]

6.2 Massaspektrometria

Massaspektrometria on analyttinen mittaustekniikka, jolla tutkitaan orgaanisten ja epäorgaanisten atomien, molekyylien tai molekyylifragmenttien massoja. Se erottelee kaasumaiset näytteet niiden massa-varaussuhteen (m/z) mukaan. Massaspektri kuvaa, minkä massaisiin fragmentteihin tutkittava yhdiste on hajonnut, minkä jälkeen yhdiste voidaan tunnistaa. Spektrissä nähdään detektorin vasteen antama intensiteetti analyysin eri m/z -arvoille. Tutkittava yhdiste on ensin ionisoitava, koska neutraaleja molekyyliä laite ei havaitse. Molekyyli voi ionisoitua ottamalla vastaan tai luovuttamalla elektronin. Syntyneet ionit lennätetään analysaattoriin, jossa erottelu tapahtuu ionien massan perusteella. Massa-analysaattori ja -detektori operoivat vakuuissa. Massadetektorit ovat hyvin herkkiä ja pystyvät tehokkaasti havaitsemaan erimassaiset ionit. Korkean erotuskyvyn massaspektrometreillä voidaan mitata massat niin suurella tarkkuudella, että piikin perusteella on mahdollista selvittää yhdisteen alkuainekoostumus., [36, 25.]

6.2.1 Näytteensyöttö

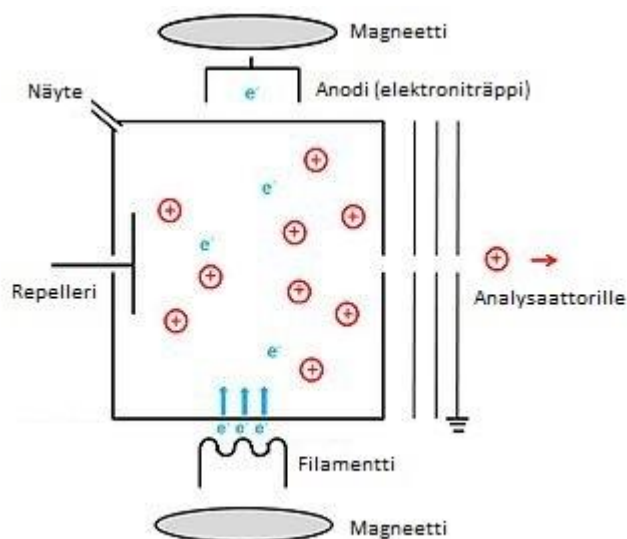
Massaspektrometrissä on oltava kaasufaasissa ennen ionisointia. Tyypillinen kaasukromatografista syötetty näyte on liuos, joten usein ionisaattorin jännitteet kytketään päälle vasta kun liuotin on läpäissyt laitteen (*solvent delay*). Näytteensyöttö tapahtuu automaattisella näytteensyöttäjällä.

6.2.2 Ionisaatio

Yleisimmin GC-MS-laitteistoissa käytettävät ionisaatiotekniikat ovat elektroni-ionisaatio sekä kemiallinen ionisaatio. Elektroni-ionisaatio (EI, ennen elektronipommitus) on yksi vanhimpia ionisaatiomenetelmiä, se kehitettiin jo vuonna 1918. Se sopii haihtuvien ja termisesti stabiilien orgaanisten yhdisteiden kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen analyysiin.

EI:ssa tuotetaan elektroneita filamentin avulla, johon on johdettu sähkövirta (kuva 11). Elektronit kiihdytetään 70 eV:n liikkeeseen filamentin ja ionilähteen välillä. Kaasumainen näyte johdetaan vakuuissa olevaan ionilähteeseen kohtisuoraan vasten elektronisäteilyä. Kohdemolekyylistä irtoaa elektroni ja siitä muodostuu kationi eli molekyyli-ioni, jolla on pariton elektroni. Muodostuneita positiivisia ioneja ohjataan positiivisen

potentiaalilin omaavan repellerielektrodin avulla kohti massa-analysointia. Ohjauslinsien avulla ohjataan ionien lentorataa. [18, 37.]



Kuva 11 Elektroni-ionisaation toimintaperiaate [40] muokaten.

Molekyylin ionisaation tarvittava energiamäärä on 10 eV, jonka jälkeen molekyyli-ionin sidokset yleensä katkeavat runsaan ylimääräisen energian takia. Elektronien korkea energia saa molekyyli-ionit tällöin fragmentoitumaan, jolloin positiivisesta molekyyli-ionista muodostuu pilkeioneja, jotka voivat olla neutraaleja tai niille voi jäädä positiivinen varaus. Kiihdytysjännitteestä riippuu, miten ja kuinka paljon molekyyli pilkkoutuu. Ionilinssejä käytetään ohjaamaan ionien lentorataa. [18, 37, 25.]

6.2.3 Massa-analysointilaitteisto

GC-MS-laitteistoissa yleisin käytetty analysointilaitteisto on kvadrupolianalysointilaitteisto. Myös muita analysointilaitteistoja käytetään jonkin verran. Kvadrupolit koostuvat neljästä yhdensuuntaisesta elektrodisauvasta, joista vastakkaiset on kytketty toisiinsa. Sauvat tuottavat värähtelevän sähkökentän, joka ohjaa ionien kulkua sopivilla tasa- ja vaihtojännitteillä, tavallaan suodattaen ioneja niiden m/z -suhteen perusteella. Jos ionien värähtely on liian laajaa, ne törmäävät sauvoihin. Jännitteitä muutettaessa muuttuu myös läpi pääsevien ionien m/z -suhde, minkä perusteella voidaan valikoida tietty m/z -alue ja mitata sen spektri. Muita, harvinaisempia ovat esimerkiksi ioniloukku (*ion trap*) ja lentoaika-analysointilaitteisto TOF (*time-of-flight*).

Lentoaika-analysaattorissa (TOF) ionit kiihtyvät vakiojännitteellä, jolloin erimassaiset ionit lentävät eri vauhdilla ja ionit detektoidaan niiden saapumisjärjestyksessä. TOF-analysaattori sopii hyvin kromatografian detektoriksi, koska mittaus on nopeaa. [25, ss. 127–128.]

Sektorilaitteissa erottelu tapahtuu sähkö- ja/tai magneettikenttien avulla. Lentäessään sähkökenttään ioni kokee voiman, joka muuttaa sen lentorataa. Kevyempien ionien lentorata kaartuu enemmän kuin painavampien. Sähkökenttää muuttamalla voidaan valita detektorille lentävät ionit. Magneettisektoreissa sopivan m/z -suhteen ionit pääsevät analysaattorin läpi tietyllä magneettikentän voimakkuudella. Korkean erotuskyvyn laitteissa käytetään sekä magneetti- että sähkösektoria. Tällöin pystytään määrittämään massaluku neljän desimaalin tarkkuudella. [25, ss. 126–127.]

Ioniloukun toimintaperiaate on samantapainen kuin kvadrupolianalysaattorilla. Elektronipurkaus ionisoi kromatografista tulevan näytteen. Radiotaajuisilla jännitteillä saadaan ioniloukussa olevat ionit ohjattua m/z -suhteen mukaan detektorille. Myös ioniloukussa syntynyt ioni voidaan fragmentoida pienemmiksi osiksi jolloin saadaan uusi spektri analysoitavaksi. [25, s. 128.]

6.2.4 Massadetektori

Massaspektrometreissa on detektorina yleensä elektronimonistin. Se muuttaa ionien sähköenergian sähköpulsseiksi. Ionit törmäävät monistimen sisäpintaan, jolloin niistä irtoaa elektroneja. Elektronit jatkavat matkaansa monistimen perää kohti ja törmäävät pian uudelleen seinään, jolloin vapautuu lisää elektroneja. Signaali vahvistetaan ja anodille saapuva elektronipulssi on verrannollinen havaitun säteilypulssin määrään. Anodilla mitataan sähkövirtaa ja massaspektri muodostuu magneettikentän mukaan sähkövirran m/z -suhteen funktiona. Analysaattorin jälkeen on asennettu poikkeutuslevy, joka ohjaa pelkästään positiiviset ionit detektorille. [25, s. 128.]

6.2.5 Massaspektri

Yleensä EI:ssa käytetään 70 V:n jännitettä, koska tällöin tuotetut spektrit ovat toistettavissa ja verrattavissa. Ylimääräinen energia saa heikoimmat sidokset katkeamaan jolloin muodostuvat lohkeamat johtavat usein stabiileihin molekyyleihin. Neutraaleja hiukkasia ei massaspektrissä havaita. Nopein tapa tulkita spektrejä olisi verrata niitä kirjas-

toon, mutta silti spektreihin on voinut tulla pieniä poikkeamia. Usein massaspektrin manuaalinen tulkitseminen on välttämätöntä, varsinkin SIM-mittausta pystyttäessä. Spekttrin suurin piikki on peruspiikki, joka voi olla myös molekyyli-ionin piikki. Molekyyli-ionin massa on sama kuin molekyylin moolimassa. Usein molekyyli-ioni on kuitenkin hajonnut, eikä sitä voida detektoida. Tällöin muiden piikkien perusteella pyritään päättämään lohkeamat ja siten selittää peruspiikki. Molekyyli-ionin massan ollessa pariton, on molekyylissä tällöin pariton määrä typpiatomeja. [25, ss. 124, 129–131.]

6.2.6 SIM-menetelmä

TIC-menetelmän ohella, jolla mitataan kaikkien ionisaattorissa syntyneiden ionien kokonaismäärää, voidaan käyttää SIM-menetelmää, jolla voidaan seurata vain yhden tai muutaman massaluvun signaaleja. SIM-menetelmää käytetään yleisesti kvantitatiivisessa analytiikassa. SIM-menetelmällä saadaan aikaan parempi herkkyys laskemalla kaiken muiden analyyttien vastetta. [18, 25.]

Yhteenveto

Menetelmän validointi onnistui kohtuullisen hyvin ja akkreditoidun menetelmän lineaarisuusalueetta saatiin laajennettua. Uuden uuttokammion kaikki validoinnille asetetut kriteerit täyttyvät. Menetelmän oikeellisuus- ja toistettavuustulokset liikkuvat kriteerien ylärajoilla, mutta määritysrajoilla kriteerit kuitenkin täyttyvät kuitenkin. Virtsan oikeellisuus ylittää sallitun 15 % poikkeaman pitoisuustasolla 5 µg/ml, mutta virtsan pitoisuutta ei varsinaisesti määritetä kvantitatiivisesti, vaan kvalitatiivisesti, joten tulosta voitaneen pitää hyväksyttävänä. Ottaen huomioon lääkeaineiden määrittelyn haasteet, saantoja voidaan pitää suhteellisen hyvinä. Pregabaliini uuttuu näissä olosuhteissa gabapentiiniä huonommin, mikä havaitaan saannoistakin. Mittausepävarmuus on kuitenkin ilmoitettu laajennettuna mittausepävarmuutena (mittausepävarmuus x2), joka ottaa laajasti huomioon kaiken mittaukseen liittyvän virheen.

Virtsanäytteiden pitoisuudet lasketaan verisuoraa vasten. Oikeellisuus- ja toistettavuusnäytteissä *qualifier*-ionien suhteet eivät täsmänneet enää verisuoran *qualifier*-ionien ionisuhteiden kanssa. Analyysissä käytettävästä nollavirtsasta havaittiin, että siitä aiheutuu taustaa gabapentiinin varmistusionille. *Scan*-ajon perusteella valittiin menetelmään yksi uusi varmistusioni, jolla voitiin korjata taustan aiheuttama ongelma.

Positiivisen paineen uuttokammion todettiin soveltuvan määrittysmenetelmään erinomaisesti ja se otettiin käyttöön osaksi jo käytössä olevaa määrittysmenetelmää.

Lähteet

- [1] Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, "Valtion palvelut: Oikeustoksikologia," 21. 5. 2015. <https://www.thl.fi/fi/thl/organisaatio/osastot-ja-yksikot/valtion-palvelut/oikeustoksikologia>. [Haettu 18. 5. 2017].
- [2] Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, "Tutkimus ja hankkeet: Jätevesitutkimus," 13. 1. 2017. <https://www.thl.fi/fi/tutkimus-ja-asiantuntijatyo/hankkeet-ja-ohjelmat/jatevesitutkimus>. [Haettu 18. 5. 2017].
- [3] Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, "THL:n päihdetestauspalvelut," 15. 5. 2015. <https://www.thl.fi/fi/web/alkoholi-tupakka-ja-riippuvuudet/paihdehoito/paihdetestaus/thl-n-paihdetestauspalvelut>. [Haettu 20. 5. 2017].
- [4] Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, "Päihdetestaus: Työelämän huumeettestaus," 21.12.2015. <https://www.thl.fi/fi/web/alkoholi-tupakka-ja-riippuvuudet/paihdehoito/paihdetestaus/tyopaikat>. [Haettu 20. 5. 2017].
- [5] Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, "Päihdetestaus: Opiskelun aikainen päihdetestaus," 21.12.2015. <https://www.thl.fi/fi/web/alkoholi-tupakka-ja-riippuvuudet/paihdehoito/paihdetestaus/oppilaitokset>. [Haettu 20. 5. 2017].
- [6] Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, "Päihdetestaus: Terveidenhoidollinen päihdetestaus," 17.6.2015. <https://www.thl.fi/fi/web/alkoholi-tupakka-ja-riippuvuudet/paihdehoito/paihdetestaus/terveydenhoidollinen-paihdetestaus>. [Haettu 20. 5. 2017].
- [7] Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, "Päihdehoito: Päihdetestaus," 21.12.2015. <https://www.thl.fi/fi/web/alkoholi-tupakka-ja-riippuvuudet/paihdehoito/paihdetestaus>. [Haettu 20. 5. 2017].
- [8] Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, "Päihdetestaus: Päihdetestauksen tekeminen," 6.10.2014. <https://www.thl.fi/fi/web/alkoholi-tupakka-ja-riippuvuudet/paihdehoito/paihdetestaus/paihdetestauksen-tekeminen>. [Haettu 20. 5. 2017].
- [9] T. L. Mersfelder ja W. H. Nichols, "Gabapentin: Abuse, Dependence, and Withdrawal," *Annals of Pharmacotherapy*, vol. 50, ss. 229–233, 2016.
- [10] D. Guay, "Pregabalin in neuropathic pain: a more "pharmaceutically elegant" gabapentin?," *The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy*, vuosik. 3, nro

- 4, ss. 274–287, 2005.
- [11] D. F. Scott, "Sodium valproate," tekijä: *The History of Epileptic Therapy: An Account of How Medication was Developed*, CRC Press, 1993, ss. 131–132.
 - [12] Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia, Helsinki: Otavan Kirjapaino Oy, 2014.
 - [13] R. Freynhagen, M. Backonja, S. Schug, G. Lyndon, B. Parsons, S. Watt ja R. Behar, "Pregabalin for the Treatment of Drug and Alcohol Withdrawal Symptoms: A Comprehensive Review," *CNS Drugs*, vuosik. 30, ss. 1191–1200, 2016.
 - [14] C. U. Johannessen ja S. I. Johannessen, "Valproate: Past, Present, and Future," *CNS Drug Reviews*, vuosik. 9, nro 2, ss. 199–216, 2003.
 - [15] K. Seppä, M. Aalto, H. Alho ja K. Kiianmaa, Huume- ja lääkeriippuvuudet, Helsinki: Duodecim, 2012.
 - [16] M. Häkkinen, "Abuse and fatal poisonings involving prescription opioids," *Väitöskirja*, Helsinki, 2015.
 - [17] B. Levine, *Principles of Forensic Toxicology*, Washington DC: The American Association for Clinical Chemistry Press, 2004, ss. 67–78.
 - [18] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 7th toim., W.H. Freeman and Company, 2007.
 - [19] Supelco - Sigma Adrich Co., "Bulletin 910 – Guide to Solid Phase Extraction," 1998.
 - [20] K. Ariniemi, *Sisäinen koulutus: Menetelmän kehitys ja muuta tärkeää*. 2008.
 - [21] R. E. Majors, "Supported Liquid Extraction: The Best-Kept Secret in Sample Preparation," *Advances in Pharmaceutical Analysis*, vuosik. 25, nro 8, ss. 430–435, 2012.
 - [22] E. Pike, "Simplifying Liquid Extractions," *The Column*, vuosik. 11, nro 3, ss. 17–21, 2015.
 - [23] Biotage, "Sample Preparation – PRESSURE+ 48 and PRESSURE+ 96," 2011.
 - [24] *Biotage PRESSURE+ 48 User Manual*, 2017.
 - [25] J. Niiranen ja S. Jaarinen, *Laboratorion analyysitekniikka*, Helsinki: Edita Prima Oy, 2008.
 - [26] F. Orata, "Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis," tekijä: *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, InTech, 2012, ss. 83–107.
 - [27] L. Nahar, A. Smith, R. Patel, R. Andrews ja S. Paterson, "Validated Method for the

- Screening and Quantification of Baclofen, Gabapentin and Pregabalin in Human Post-Mortem Whole Blood Using Protein Precipitation and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *Journal of Analytical Toxicology*, vuosik. 41, nro 5, ss. 441–450, 2017.
- [28] R. Oertel, N. Arenz, J. Pietsch ja W. Kirch, "Simultaneous determination of three anticonvulsants using hydrophilic interaction LC-MS," *Journal of Separation Science*, vuosik. 32, nro 2, ss. 238–243, 2009.
- [29] R. S. Gujral ja S. M. Haque, "A Validated Method without Derivatization for the Determination of Gabapentin in Bulk, Pharmaceutical Formulation and Human Urine Samples," *International Journal of Biomedical Science*, vuosik. 5, nro 2, ss. 169–174, 2009.
- [30] M. K. R. Mudiam, A. Chauhan, R. Jain, R. Ch, G. Fatima, E. Malhotra ja R.C. Murthy, "Development, validation and comparison of two microextraction techniques for the rapid and sensitive determination of pregabalin in urine and pharmaceutical formulations after ethyl chloroformate derivatization followed by gc-ms," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, nro 70, ss. 310–319, 2012.
- [31] R. Heltsley, A. DePriest, D. L. Black, T. Robert, Y. H. Caplan ja E.J. Cone, "Urine Drug Testing of Chronic Pain Patients. IV. Prevalence of Gabapentin and Pregabalin," *Journal of Analytical Toxicology*, vuosik. 35, ss. 357–359, 2011.
- [32] T. Hložek, M. Bursová, P. Coufal ja R. Čabala, "Gabapentin, Pregabalin and Vigabatrin Quantification in Human Serum by GC-MS After Hexyl Chloroformate Derivatization," *Journal of Analytical Toxicology*, vuosik. 40, ss. 749–753, 2016.
- [33] C. Priez-Barallon, J. Carlier, B. Boyer, M. Benslim, L. Fanton, C. Mazoyer ja Y. Gaillard, "Quantification of Pregabalin Using Hydrophilic Interaction HPLC-High-Resolution MS in Postmortem Human Samples: Eighteen Case Reports," *Journal of Analytical Toxicology*, vuosik. 38, ss. 143–148, 2014.
- [34] N. Sadones, E. Van Bever, L. Van Bortel, W. E. Lambert ja C. P. Stove, "Dried blood spot analysis of gabapentin as a valid alternative for serum: a bridging study," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vuosik. 132, ss. 72–76, 2017.
- [35] L. L. Garcia, Z. K. Shibabi ja K. Oles, "Determination of gabapentin in serum by capillary electrophoresis," *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vuosik. 669, nro 1, ss. 157–162, 1995.
- [36] R. Ketola, R. Kostianen, T. Kotiaho ja P. Vainiotalo, Toim., Massaspektrometrian

perusteet, Helsinki: Hakapaino, 2010.

[37] H.-J. Hübschmann, Handbook of GC/MS, Weinheim: WILEY-VCH, 2009.

[38] Agilent Technologies, *Capillary Flow Technology: Deans Switch*, Agilent Technologies Inc, 2013.